

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004929

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-102236
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 2 2 3 6

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 1 0 2 2 3 6

出 願 人
Applicant(s): 住友ベークライト株式会社
西村 紳一郎

2 0 0 5 年 4 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	PKB04301
【提出日】	平成16年 3月31日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	G01N 33/545
【発明者】	
【住所又は居所】	北海道札幌市中央区北9条西16丁目1-1-302
【氏名】	西村 紳一郎
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都品川区東品川2丁目5番8 住友ベークライト株式会社内
【氏名】	島岡 秀行
【特許出願人】	
【識別番号】	000002141
【氏名又は名称】	住友ベークライト株式会社
【代表者】	守谷 恒夫
【特許出願人】	
【識別番号】	598107703
【氏名又は名称】	西村 紳一郎
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	003539
【納付金額】	21,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	特許請求の範囲 1
【物件名】	明細書 1
【物件名】	図面 1
【物件名】	要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

糖鎖を捕捉する担体に用いるポリマー粒子であって、ポリマー粒子の表面に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有することを特徴とするポリマー粒子。

【請求項 2】

糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がオキシシラミノ基，ヒドラジド基，及びセミチオカルバジド基から選ばれる少なくとも一つである請求項 1 記載のポリマー粒子。

【請求項 3】

糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がオキシシラミノ基である請求項 1 記載のポリマー粒子。

【請求項 4】

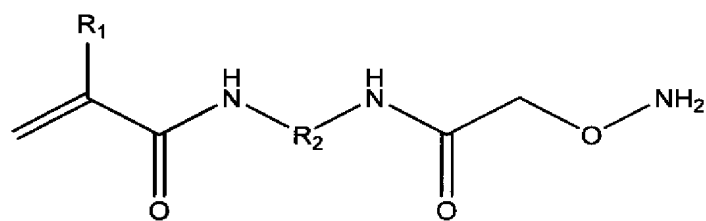
ポリマー粒子が糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマー又は該モノマーの誘導体を重合したポリマーから構成されるものである請求項 1～3 いずれか記載のポリマー粒子。

【請求項 5】

糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマーが下記一般式（1）で表されるモノマー又は該モノマーの誘導体を含むものである請求項 4 記載のポリマー粒子。

【化 1】

（1）



（式中、R₁はH又はC H₃、R₂は任意の分子鎖でヘテロ原子を含んでもよい。）

【請求項 6】

ポリマーが糖鎖のアルデヒド基と反応しないモノマーとの共重合体である請求項 4 又は 5 記載のポリマー粒子。

【請求項 7】

糖鎖のアルデヒド基と反応しないモノマーが架橋剤として多官能性モノマーを含むものである請求項 5 記載のポリマー粒子。

【請求項 8】

重合が懸濁重合法によるものである請求項 4～7 いずれか記載のポリマー粒子。

【請求項 9】

重合が乳化重合法によるものである請求項 4～7 いずれか記載のポリマー粒子。

【請求項 10】

ポリマー粒子の形状が球状の粒子である請求項 1～9 いずれか記載のポリマー粒子。

【請求項 11】

粒子の平均粒径が0.05～200 μmである請求項 10 記載のポリマー粒子。

【請求項 12】

請求項 1～11 いずれか記載のポリマー粒子を用いて糖鎖を捕捉する工程、及び糖鎖を分離する工程を有することを特徴とする糖鎖の精製方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ポリマー粒子

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体組織など英雑物を含む試料から糖鎖および糖鎖含有物質を分離・精製・濃縮するために用いるポリマー粒子に関する。

【背景技術】

【0002】

糖鎖とは、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、キシロース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、シアル酸などの単糖およびこれらの誘導体がグリコシド結合によって鎖状に結合した分子の総称である。

【0003】

糖鎖は、非常に多様性に富んでおり、天然に存在する生物が有する様々な機能に関与する物質である。糖鎖は生体内でタンパク質や脂質などに結合した複合糖質として存在することが多く、生体内の重要な構成成分の一つである。生体内の糖鎖は細胞間情報伝達、タンパク質の機能や相互作用の調整などに深く関わっていることが明らかになりつつある。

【0004】

例えば、糖鎖を有する生体高分子としては、細胞の安定化に寄与する植物細胞の細胞壁のプロテオグリカン、細胞の分化、増殖、接着、移動等に影響を与える糖脂質、及び細胞間相互作用や細胞認識に関与している糖タンパク質等が挙げられるが、これらの高分子の糖鎖が、互いに機能を代行、補助、増幅、調節、あるいは阻害しあいながら高度で精密な生体反応を制御する機構が次第に明らかにされつつある。さらに、このような糖鎖と細胞の分化増殖、細胞接着、免疫、及び細胞の癌化との関係が明確にされれば、この糖鎖工学と、医学、細胞工学、あるいは臓器工学とを密接に関連させて新たな展開を図ることが期待できる。

【0005】

その一例として、細胞表面の糖鎖や、糖鎖-レセプター間の相互作用異常による疾病の発生、あるいはエイズなどのウイルス感染における糖鎖の役割等に関する研究が活発化してきている。また、細胞-細胞間相互作用、細胞-マトリックス間相互作用における糖鎖の関与に関する研究も、生体反応を理解する上で重要になってきている（たとえば、非特許文献1）。

【0006】

これらの解析のため、糖鎖構造解析の技術が開発されており、これらの技術は、複合糖質からの糖鎖切り出し、糖鎖の分離精製、糖鎖の標識化などの工程を組み合わせたものであるが、これらの工程はきわめて煩雑である。特に、英雑物を含む試料から糖鎖のみを回収する分離精製工程は非常に困難で、高度の熟練を要する。

【0007】

糖鎖の分離精製には、たとえば、イオン交換樹脂、逆相クロマトグラフィ、活性炭、ゲル濾過クロマトグラフィなどの手法が用いられるが、これらの分離手段は糖を特異的に認識する方法ではないので、英雑物（ペプチド、タンパク質など）の混入が避けられず、また糖鎖の構造によって回収率に差異が生じることが多い。さらに、クロマトグラフィで糖鎖を高精度に分離する場合には、糖鎖にピリジルアミノ化などの蛍光標識を施す必要があり、煩雑な操作が必要となる。蛍光標識した糖鎖を分析するには、標識後の反応液中より未反応の2-アミノピリジン等の夾雑物を除き、該標識化糖鎖を精製することが必要である。

【0008】

一般には、該標識化糖鎖と夾雑物の分子量の差を利用してゲルろ過を行い、夾雑物を除去する。しかしながら、この方法は器具を多く用いる点と、操作に多くの時間を要する点から、多数の試料を短時間に処理するのは困難である。また、簡易な方法として共沸により夾雑物を留去する方法も試みられているが、十分に夾雑物を除去するのは難しい。糖鎖

構造と各種疾患の関係を調べるためには、統計的処理が可能な多数の検体の糖鎖構造を調べる必要がある。この場合、従来法のように煩雑な手法を用いると膨大なコストと時間が必要になる。そこで、簡単な作業で糖鎖を分離精製する手段が求められていた。

【非特許文献1】 コールドスプリングハーバー「糖鎖生物学」，丸善，2003年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、生体組織など英雑物を含む試料から糖鎖および糖鎖含有物質のみを、簡単な操作で分離精製するための、ポリマー粒子を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、

(1) 糖鎖を捕捉する担体に用いるポリマー粒子であって、ポリマー粒子の表面に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有することを特徴とするポリマー粒子、

(2) 糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がオキシルアミノ基、ヒドラジド基、及びセミチオカルバジド基から選ばれる少なくとも一つである(1)記載のポリマー粒子、

(3) 糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基がオキシルアミノ基である(1)記載のポリマー粒子、

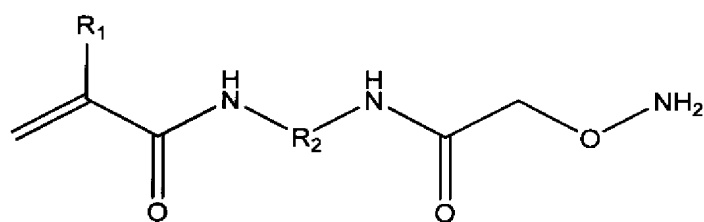
(4) ポリマー粒子が糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマー又は該モノマーの誘導体を重合したポリマーから構成されるものである(1)～(3)いずれか記載のポリマー粒子、

(5) 糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマーが下記一般式(1)で表されるモノマー又は該モノマーの誘導体を含むものである(4)記載のポリマー粒子、

【0011】

【化2】

(1)



【0012】

(式中、R₁はH又はCH₃、R₂は任意の分子鎖でヘテロ原子を含んでもよい。)

(6) ポリマーが糖鎖のアルデヒド基と反応しないモノマーとの共重合体である(4)又は(5)記載のポリマー粒子、

(7) 糖鎖のアルデヒド基と反応しないモノマーが架橋剤として多官能性モノマーを含むものである(5)記載のポリマー粒子、

(8) 重合が懸濁重合法によるものである(4)～(7)いずれか記載のポリマー粒子、

(9) 重合が乳化重合法によるものである(4)～(7)いずれか記載のポリマー粒子、

(10) ポリマー粒子の形状が球状の粒子である(1)～(9)いずれか記載のポリマー粒子、

(11) 粒子の平均粒径が0.05～200 μmである(10)記載のポリマー粒子、

(12) (1)～(11)いずれか記載のポリマー粒子を用いて糖鎖を捕捉する工程、及び糖鎖を分離する工程を有することを特徴とする糖鎖の精製方法、である。

【発明の効果】

【0013】

本発明のポリマー粒子を用いると、蛍光標識化、クロマトグラフによる分離などの煩雑な工程を経ることなく、簡便な方法で糖鎖および糖鎖含有物質を分離精製することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

（糖鎖捕捉のための官能基）

糖鎖は生体内物質のなかで唯一、アルデヒド基をもつ物質である。すなわち、糖鎖は水溶液などの状態で環状のヘミアセタール型と、非環状型のアルデヒド型とが平衡で存在する。タンパク質や核酸、脂質など糖鎖以外の生体内物質にはアルデヒド基が含まれていない。このことから、アルデヒド基と特異的に反応して安定な結合を形成する官能基を利用すれば、糖鎖のみを選択的に捕捉することが可能である。アルデヒド基と特異的に反応する官能基としては、たとえばオキシルアミノ基、ヒドラジド基、アミノ基、セミチオカルバジド基ならびにそれらの誘導体を好ましく、オキシルアミノ基がより好ましい。オキシルアミノ基とアルデヒド基との反応によって生じるオキシム結合は、酸処理などによって容易に切断されるため、糖鎖を捕捉したのち、糖鎖を担体から簡単に切り離すことができる。一般的に、生理活性物質の捕捉・担持にはアミノ基が多用されているが、アミノ基とアルデヒド基の反応によって生じる結合（シッフ塩基）は結合力が弱いいため、還元剤などを用いた二次処理が必要であることから、アミノ基は糖鎖の捕捉には好ましくない。

（ポリマー粒子の性状）

糖鎖を捕捉するための担体（以下、捕捉担体と略）に用いるポリマー粒子は、少なくとも表面の一部に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有した固体あるいはゲル粒子であることが好ましい。ポリマー粒子が固体粒子あるいはゲル粒子であれば、ポリマー粒子に糖鎖を捕捉させたのち、遠心分離やろ過などの手段によって容易に回収することができる。また、ポリマー粒子をカラムに充填して用いることも可能である。カラムに充填して用いる方法は、特に連続操作化の観点から重要となる。

【0015】

ポリマー粒子の形状は特に限定しないが、球状またはそれに類する形状が好ましい。ポリマー粒子が球状の場合、平均粒径は好ましくは $0.05 \sim 1000 \mu\text{m}$ であり、より好ましくは $0.05 \sim 200 \mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $0.1 \sim 200 \mu\text{m}$ であり、最も好ましくは $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ である。平均粒径が下限値未満では、ポリマー粒子をカラムに充填して用いる際、通液性が悪くなるために大きな圧力を加える必要がある。また、ポリマー粒子を遠心分離やろ過で回収することも困難となる。平均粒径が上限値を超えると、ポリマー粒子と試料溶液の接触面積が少なくなり、糖鎖捕捉の効率が低下する。

【0016】

ポリマー粒子は、遠心分離やろ過などの手段で回収する時にのみ固体粒子あるいはゲル粒子であってもよい。具体的には、たとえば温度、pHなどの環境変化によって溶解性が変化するポリマーを用いることにより、溶媒に溶解した状態の該ポリマーに糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を介して糖鎖を捕捉させたのち、溶解性を変化させて該ポリマーを沈殿させ、回収するといった手法をとることが可能である。環境によって溶解性が変化するポリマーとして、たとえばポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を挙げることができる。ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）分子の少なくとも一部に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を導入することで、上記のような糖鎖捕捉が可能となる。

（捕捉担体の作製）

捕捉担体は、量産性の観点からポリマー粒子から構成されることが好ましい。ポリマーは、例えば糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマー又は該モノマーの誘導体を重合することによって作製することができる。モノマーはビニル系モノマーであることが好ましく、たとえばメタクリル酸誘導体、アクリル酸誘導体、スチレン誘導

体、プロピレン誘導体、アクリルアミド誘導体などを好ましく用いることができ、メタクリル酸誘導体がより好ましい。

【0017】

モノマーは側鎖にオキシルアミノ基を有することが好ましく、オキシルアミノ基は t -ブトキシカルボニル(BOC)基や9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基などの保護基で保護されていてもよい。オキシルアミノ基とビニル基との間にはスペーサー分子鎖が存在しても良い。特に、酸素原子などのヘテロ原子を含むスペーサー分子鎖が存在すると、オキシルアミノ基の周囲が親水性環境となり、糖鎖との親和性が向上するため特に好ましい。

【0018】

ポリマーは糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマーの単独重合体であってもよく、糖鎖のアルデヒド基と反応しない他種のモノマーとの共重合体であってもよい。粒子状のポリマーを得るためには、懸濁重合、乳化重合などの不均一系重合法によることが好ましい。このとき、多官能性モノマーを架橋剤として共重合させることにより、粒子の剛性を調整することが可能である。架橋剤としてはジビニル化合物、たとえばエチレングリコールジメタクリレート、ジビニルベンゼン、メチレンビスアクリルアミドなどを適宜用いることができる。架橋剤の鎖長を変化させることによって粒子の物性を制御することも可能である。また、架橋剤以外のモノマーを共重合することも可能である。このとき、共重合組成比を変化させることにより、ポリマー中のオキシルアミノ基の密度をコントロールすることが可能である。オキシルアミノ基密度のコントロールは、糖鎖捕捉効率の最適化の観点から重要である。

【0019】

糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマーの重合とは別の手段として、糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有しないポリマーに、ポリマー側鎖の別の官能基などを介して糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基をグラフトする方法も可能である。

(糖鎖捕捉)

本発明のポリマー粒子を用いて糖鎖を精製する方法について記述する。血清、組織片、細胞などの生体試料から、グリコペプチダーゼなどの酵素的方法、あるいはヒドラジン分解などの化学的方法を用いて糖鎖を切り出したのち、本発明のポリマー粒子と接触させることによって糖鎖のみを選択的に回収する。ポリマー粒子の糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基と糖鎖のアルデヒド基が結合することにより、糖鎖のみがポリマー粒子に担持される。

【0020】

糖鎖捕捉時の反応系のpHは、好ましくは2~9、より好ましくは2~7であり、さらに好ましくは2~6である。pH調整のためには、各種緩衝液を用いることができる。糖鎖捕捉時の温度は、好ましくは4~90℃、より好ましくは4~70℃、さらに好ましくは10~70℃であり、最も好ましくは15~60℃である。反応時間は適宜設定することができる。ポリマー粒子をカラムに充填して試料溶液を通過させてもよい。

(糖鎖回収)

ポリマー粒子の表面には糖鎖以外の英雑物が非特異的に吸着しているため、これらを洗浄除去する必要がある。洗浄液として、水、緩衝液、界面活性剤を含む水または緩衝液、有機溶剤などを適宜組み合わせ用いることが好ましい。特に好ましい形態は、界面活性剤を含む水または緩衝液で十分に洗浄したのち、有機溶剤で洗浄し、最後に水で洗浄する方法である。これらの洗浄により、非特異的吸着物は実質的に全てポリマー粒子から除去される。

【0021】

洗浄後、ポリマー粒子と糖鎖の結合を切断し、糖鎖を切り出すことができる。糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基としてオキシルアミノ基を有するポリマー粒子の場合、糖鎖との結合はオキシム結合であり、この結合は酸処理などによって切断することができる。

できる。糖鎖を切り出すために、0.1～10体積%のトリフルオロ酢酸水溶液を好適に用いることができる。酸処理以外の方法で糖鎖を切り出すことも可能である。上記の方法によって精製された糖鎖は、タンパク質、ペプチド、核酸などの英雑物を含まない純粋な糖鎖であり、そのまま質量分析、核磁気共鳴分析、免疫的分析法などの分析手段によって評価が可能である。

【0022】

以上のように、本発明のポリマー粒子を用いることで、1) サンプル溶液とポリマー粒子を分散し反応、2) ポリマー粒子表面の英雑物を洗浄除去、3) 糖鎖-ポリマー粒子の結合を切断、という操作で糖鎖の精製・回収が可能となり、従来法と比べて簡便な糖鎖精製を実現することが可能となった。また、本発明のポリマー粒子は量産化が容易であり、産業上の利用を考慮した場合にも有利である。

【実施例】

【0023】

《実施例1》

(オキシルアミン含有モノマーの合成)

5gの無水メタクリル酸(和光純薬工業(株)製)と25gの2,2'- (エチレンジオキシ)ビス(エチルアミン)を200mlのクロロホルム中で16時間反応させた。反応の進行は薄層クロマトグラフィ(TLC)で確認した。反応終了後、シリカゲルクロマトグラフィによる通常の方法で精製を行ったのち、溶媒を留去した。

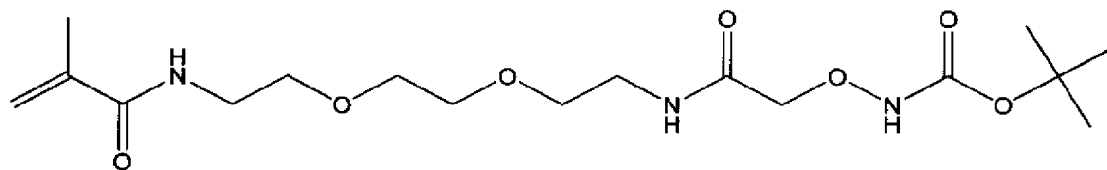
【0024】

生成物を再びクロロホルムに溶解し、10gの水溶性カルボジイミド(和光純薬工業(株)製)、および、5gのBOC-アミノオキシ酢酸(Novabiochem社製)を投入し、室温で16時間反応させた。反応の進行はTLCで確認した。反応終了後、純水で3回抽出したのち、シリカゲルクロマトグラフィにより精製した。核磁気共鳴分析(NMR)およびマトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型質量分析器(MALDI-TOF-MS, Bruker社製 'UltraFlex')で生成物の確認を行った。合成したモノマーの構造式を下式(2)に示す。

【0025】

【化3】

(2)



【0026】

(ポリマー粒子の合成)

上記の方法により合成したモノマー1gをクロロホルム1mlに溶解し、還流冷却管を取り付けた反応容器内に投入した。反応容器内に30mlの純水、0.05gのポリビニルアルコール(和光純薬工業(株)製、重合度約1500)を投入し、反応容器を65℃の恒温槽内に設置した。反応容器内の溶液を攪拌しながら、30分間窒素バージを行った。0.05gの2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)を微量のクロロホルムに溶解したものを反応容器内に注入し、重合反応を開始した。16時間反応後、反応容器を冷水に浸漬し、重合反応を停止した。反応容器内に生成した沈殿を遠心分離で回収し、沈殿をメタノールおよび純水で各5回洗浄した。

【0027】

洗浄後の沈殿を容器に入れ、トリフルオロ酢酸をメタノールで3倍に希釈した溶液を沈殿量に対して大過剰加えた。反応容器を40℃の恒温槽内に入れ、振とうしながら3時間

反応させ、オキシルアミノ基に結合している保護基（BOC基）を除去した。反応終了後、沈殿を遠心分離で回収し、メタノールおよび純水で各5回洗浄し、ポリマー粒子を作製した。得られたポリマー粒子の平均粒径は約10 μ mであった。

（糖鎖精製）

（モデル糖鎖を用いた糖鎖捕捉率測定）

N-アセチルラクトサミン（Sigma社製）1mgを100 μ lの純水に溶解した。この溶液に上記の方法で作製したポリマー粒子10mg分散させた。塩酸緩衝液で溶液のpHを2に調整し、振とうしながら40℃で16時間反応させた。反応後、遠心分離でポリマー粒子を沈殿させ、上清を取り除いた。回収したポリマー粒子を、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、50%メタノール、純水でそれぞれ5回ずつ洗浄した。洗浄後、ポリマー粒子を10%トリフルオロ酢酸中に分散させ、室温で3時間振とうすることで糖鎖を遊離させた。遠心分離によりポリマー粒子を沈殿させ、上清を回収した。回収した上清を凍結乾燥し、糖鎖サンプルとした。

【0028】

回収した糖鎖サンプルの量を、定法に従ってオルシノール／硫酸法で定量し、糖鎖捕捉率を求めた。結果を表1に示す。比較例と比べて糖鎖捕捉率が有意に高くなっており、本発明のポリマー粒子により、糖鎖が効率よく回収できることが示された。

（糖タンパク質からの糖鎖精製）

《実施例2》

マウス由来の免疫グロブリンG（IgG）50mgをプロテアーゼ処理したのち、定法に従って、N-グリコペプチダーゼFを用いてN結合型糖鎖を切り出した。この溶液に10mgの実施例1で作製したポリマー粒子を分散させ、pHを2に調整したのち、振とうしながら40℃で16時間反応させた。反応後、遠心分離でポリマー粒子を沈殿させ、上清を取り除いた。回収したポリマー粒子を、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、50%メタノール、純水でそれぞれ5回ずつ洗浄した。洗浄後、ポリマー粒子を10%トリフルオロ酢酸中に分散させ、室温で3時間振とうすることで糖鎖を遊離させた。遠心分離によりポリマー粒子を沈殿させ、上清を回収した。回収した上清を凍結乾燥し、糖鎖サンプルとした。

【0029】

得られた糖鎖サンプルをMALDI-TOF-MSにより分析した。マトリックスには2,5-ジヒドロキシ安息香酸を用いた。測定結果を図1に示す。糖鎖に由来する分子量ピークが明確に現れており、本発明のポリマー粒子を用いて、糖タンパク質の糖鎖が精製・回収できることが示された。

《実施例3》

鶏卵由来の卵白アルブミン50mgを用いて、実施例2と同様の方法で糖鎖サンプルを精製し、MALDI-TOF-MSにより分析した。測定結果を図2に示す。糖鎖に由来する分子量ピークが明確に現れており、本発明のポリマー粒子を用いて、糖タンパク質の糖鎖が精製・回収できることが示された。

《実施例4》

マウスの皮膚から真皮組織を採取し、アセトンで脱脂後、細片化した。実施例2と同様の方法で糖鎖サンプルを精製し、MALDI-TOF-MSにより分析した。測定結果を図3に示す。糖鎖に由来する分子量ピークが明確に現れており、本発明のポリマー粒子を用いて、生体試料から糖鎖が精製・回収できることが示された。

《比較例1》

（ポリマー粒子の合成）

メタクリル酸メチルモノマー1gをクロロホルム1mlと混合し、還流冷却管を取り付けた反応容器内に投入した。反応容器内に30mlの純水、0.05gのポリビニルアルコール（和光純薬工業（株）製、重合度約1500）を投入し、反応容器を65℃の恒温槽内に設置した。反応容器内の溶液を攪拌しながら、30分間窒素バージを行った。0.05gの2,2'-アゾピス（イソブチロニトリル）を微量のクロロホルムに溶解したも

のを反応容器内に注入し、重合反応を開始した。16時間反応後、反応容器を冷水に浸漬し、重合反応を停止した。反応容器内に生成した沈殿を遠心分離で回収し、沈殿をメタノールおよび純水で各5回洗浄して、ポリマー粒子を作製した。

（糖鎖精製）

N-アセチルラクタサミン（Sigma社製）1mgを100μlの純水に溶解した。この溶液に上記の方法で作製したポリマー粒子を10mg分散させた。塩酸緩衝液で溶液のpHを2に調整し、振とうしながら40℃で16時間反応させた。反応後、遠心分離でポリマー粒子を沈殿させ、上清を取り除いた。回収したポリマー粒子を、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、50%メタノール、純水でそれぞれ5回ずつ洗浄した。洗浄後、ポリマー粒子を10%トリフルオロ酢酸中に分散させ、室温で3時間振とうした。遠心分離によりポリマー粒子を沈殿させ、上清を回収した。回収した上清を凍結乾燥し、比較サンプルとした。

【0030】

回収したサンプル中に含まれる糖鎖の量を、定法に従ってオルシノール／硫酸法で定量した。結果を表1に示す。糖鎖はほとんど回収されておらず、糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を含まないポリマー粒子では、糖鎖を精製できないことが示された。

【0031】

【表1】

	ポリマー粒子	糖鎖捕捉率
実施例1	オキシルアミノ基を含むポリマー粒子	65%
比較例1	オキシルアミノ基を含まないポリマー粒子	5%

【産業上の利用可能性】

【0032】

本発明のポリマー粒子を用いると、蛍光標識化やクロマトグラフによる精製など煩雑な工程を経ることなく、簡単な操作で糖鎖および糖鎖含有物質を分離精製することが可能となる。本発明のポリマー粒子は、カラムなどに充填して用いることもでき、糖鎖精製の自動化・連続操作化が容易に実現される。

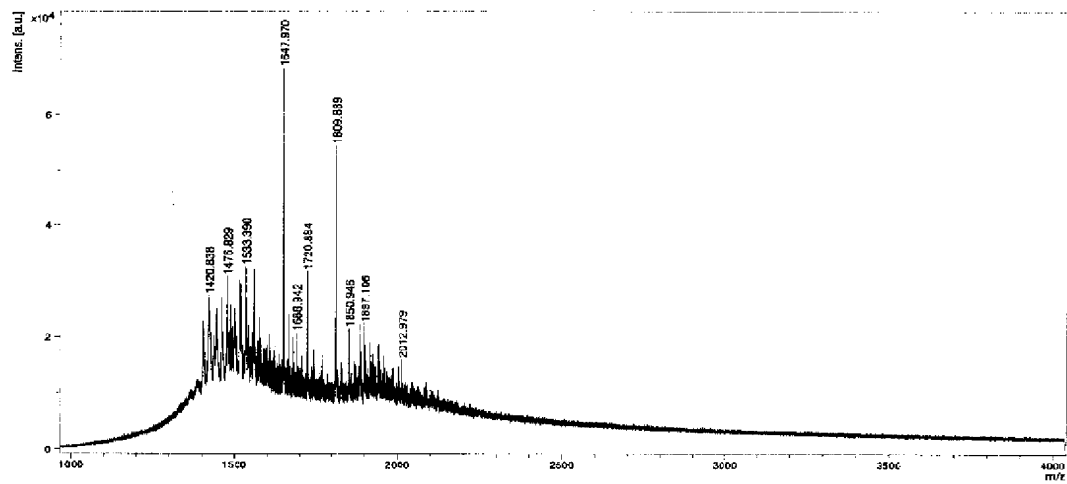
【図面の簡単な説明】

【0033】

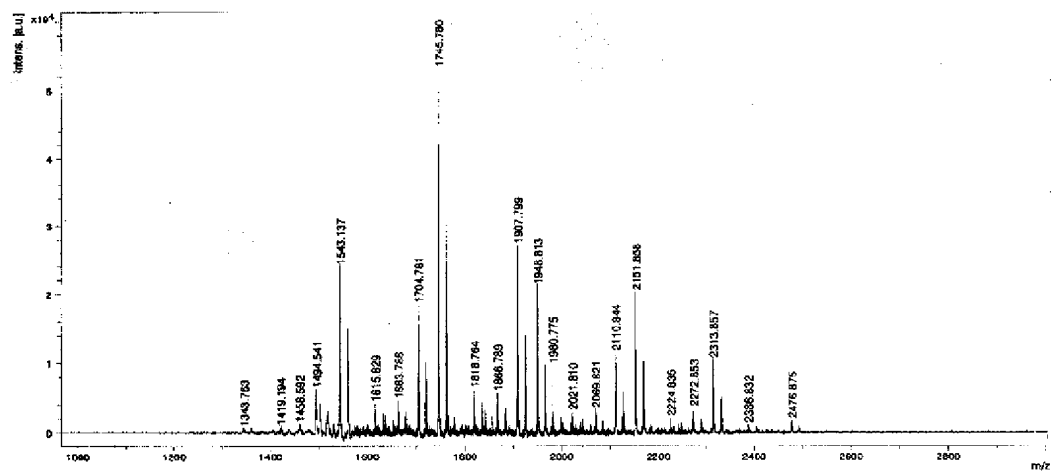
- 【図1】 実施例2の糖鎖サンプルのMALDI-TOF-MSによる分析結果
- 【図2】 実施例3の糖鎖サンプルのMALDI-TOF-MSによる分析結果
- 【図3】 実施例4の糖鎖サンプルのMALDI-TOF-MSによる分析結果

【書類名】 図面

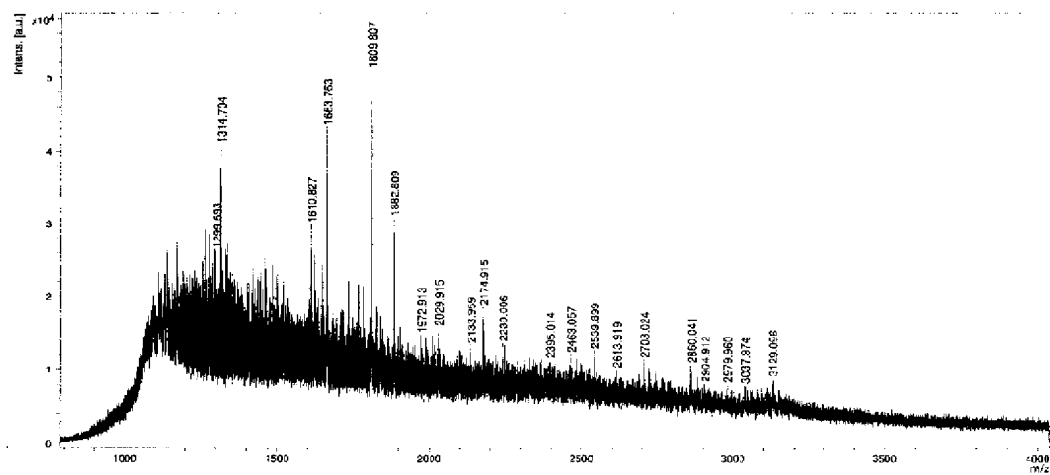
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体組織など英雑物を含む試料から糖鎖および糖鎖含有物質のみを、蛍光標識化やクロマトグラフによる精製など煩雑な工程を経ることなく、簡単な操作で分離精製するためのポリマー粒子を提供すること。

【解決手段】 糖鎖を捕捉する担体に用いるポリマー粒子であって、ポリマー粒子の表面に糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するポリマー粒子であり、好ましくは官能基がオキシルアミノ基，ヒドラジド基，及びセミチオカルバジド基から選ばれる少なくとも一つであり、ポリマー粒子が糖鎖のアルデヒド基と特異的に反応する官能基を有するモノマー又は該モノマーの誘導体を重合したポリマーから構成されるものであるポリマー粒子。

【選択図】 図 1

【書類名】	手続補正書
【提出日】	平成16年 4月 5日
【あて先】	特許庁長官 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2004-102236
【補正をする者】	
【識別番号】	598107703
【氏名又は名称】	西村 紳一郎
【手続補正1】	
【補正対象書類名】	特許願
【補正対象項目名】	特許出願人
【補正方法】	追加
【補正の内容】	
【その他】	本件手続をしたことに相違ありません。

出願人履歴

0 0 0 0 0 2 1 4 1

20021211

住所変更

5 9 2 2 5 8 8 5 6

東京都品川区東品川 2 丁目 5 番 8 号

住友ペークライト株式会社

5 9 8 1 0 7 7 0 3

19980810

新規登録

北海道札幌市中央区北 9 条西 1 6 丁目 1 − 1 − 3 0 2

西村 紳一郎